

19 BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND



DEUTSCHES
PATENTAMT

12 **Offenlegungsschrift**
10 **DE 196 24 562 A 1**

51 Int. Cl.⁶:
C 12 Q 1/68
G 01 N 33/53

21 Aktenzeichen: 196 24 562.1
22 Anmeldetag: 20. 6. 96
43 Offenlegungstag: 2. 1. 98

DE 196 24 562 A 1

71 Anmelder:

Köhler, Thomas, Dr., 04109 Leipzig, DE; Rost,
Anne-Katrin, Dipl.-Biol., 04720 Döbeln, DE

74 Vertreter:

Manfred Köhler und Kollegen, 04229 Leipzig

72 Erfinder:

gleich Anmelder

54 Verfahren zur Bestimmung von Konzentrationsverhältnissen zweier sich um mindestens ein Nucleotid unterscheidender Nucleinsäuren und Testkit zur Durchführung des Verfahrens

57 Verfahren zur Bestimmung von Konzentrationsverhältnissen zweier sich in der Sequenz um mindestens ein Nucleotid unterscheidender Nucleinsäuren, die Produkte einer vorhergehenden spezifischen Nucleinsäurenvermehrung sind, wobei alle nachfolgenden Detektionsschritte an einer festen Phase durchgeführt werden, dabei zur Diskriminierung immobilisierter einzelsträngiger DNA-Fragmente eine einzige, nichtradioaktiv markierte, freie oder an der festen Phase immobilisierte DNA-Sonde eingesetzt wird, welche nur einer der beiden nachzuweisenden Nucleinsäure-Einzelstränge vollständig komplementär ist, wobei nach erfolgter Hybridisierung ausschließlich bei vollständiger Komplementarität ein partieller DNA-Doppelstrang mit einer nur für eine Nucleinsäure spezifischen Restriktionsschnittstelle entsteht, welche unter Einsatz eines diese Schnittstelle erkennenden Restriktionsenzym unter gleichzeitiger Abspaltung eines die Markierung tragenden Abschnitts der Sonde bzw. Nucleinsäure hydrolysiert wird, während das unvollständig hybridisierte Fragment keinem solchen Restriktionsverdau unterliegt und somit die adsorbierte Sondenmarkierung erhalten bleibt.

DE 196 24 562 A 1

Beschreibung

Gegenstand der Erfindung ist ein Verfahren zur qualitativen Unterscheidung bzw. Bestimmung von Konzentrationsverhältnissen zweier ähnlicher Nucleinsäuren, ein Satz von 4 Oligonucleotiden, die hierfür geeignet sind, ein Testkit, mit dem das erfindungsgemäße Verfahren durchgeführt werden kann sowie eine Vielzahl von Verwendungsmöglichkeiten des Verfahrens für den Nachweis von Infektionen sowie zur Messung von Genexpressionen.

Die schnelle Entwicklung molekularbiologischer Techniken besonders in den letzten 10 Jahren gestattet es, nahezu jede interessierende Nucleinsäure qualitativ und semiquantitativ zu messen. Vielfach ist es aber notwendig, die Absolutzahl von Kopien einer Nucleinsäure zu kennen, beispielsweise um reproduzierbare Aussagen zur Expression tumorassoziierter Gene (z. B. der "Multidrug resistance"-Gene MRP, *mdr-1*) zu treffen bzw. den Therapieerfolg nach immunmodulatorischer Behandlung von Viruserkrankungen (z. B. von Infektionen mit den Hepatitis-Viren HBV, HCV sowie den humanen Hochrisiko-Papilloma-Viren der Typen 16 und 18, etc.) beurteilen zu können. Hierzu werden neben klassischen, meist zeitlich sehr aufwendigen Hybridisierungstechniken (z. B. Northern/Southern Blot) mit zunehmendem Erfolg quantitative Amplifikationstechniken eingesetzt. Diese weisen um mehrere Zehnerpotenzen höhere Sensitivitäten auf, was im Besonderen für die Detektion seltener mRNA-Spezies oder bei limitiert zur Verfügung stehendem Probenmaterial relevant ist.

Seit ihrer Erstbeschreibung (BECKER-ANDRE et al., Nucl. Acids Res.; 17: 9437—9446 (1989), WANG et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA; 86: 9717—9721 (1989)) wird u. a. die competitive Polymerase Chain Reaction (PCR) (US-Pat. 5213961) für Quantifizierungs-Reaktionen eingesetzt, da diese Methodik trotz ihrer exponentiellen Natur zuverlässige und reproduzierbare Ergebnisse erbringt. Die zu quantifizierende Nucleinsäure (Target-DNA) und ein exogen zugesetzter Standard (Competitor) definierter Konzentration werden simultan in einem PCR-Ansatz unter Nutzung nur eines gemeinsamen Primerpaares amplifiziert. Nach erfolgter Vervielfältigung kann aus dem Konzentrationsverhältnis beider synthetisierten Produkte auf die Ausgangskonzentration der gesuchten Nukleinsäure vor der Amplifizierung geschlossen werden. Dieser Zusammenhang gilt allerdings nur, wenn Competitor und Target mit gleicher Effizienz amplifizierbar sind. Dies ist aber nur dann gewährleistet, wenn ideale, d. h. im Vergleich zum Target nahezu vollständig homologe Competitoren zur Verfügung stehen.

Technische Schwierigkeiten insbesondere in Hinblick auf den routinediagnostischen Einsatz der Methodik bestehen in der Ermittlung des Konzentrationsverhältnisses zwischen den beiden kompetitiv erzeugten, Competitor- bzw. Target-abgeleiteten PCR-Fragmenten. Dem Fachmann bekannte elektrophoretische und chromatographische Trennverfahren gekoppelt mit geeigneten Auswertetechniken (z. B. Densitometrie, automatische Auswertung von HPLC-Chromatogrammen) setzen aber ausreichende Differenzierbarkeit beider Fragmente voraus. Dies ist allerdings nur möglich, wenn ungünstige, in der Länge variierende und somit nur partiell homologe Competitoren verwendet werden. Ein weiterer Nachteil besteht darin, daß elektrophoretische und chromatographische Verfahren in der Regel manuell und apparatetechnisch sehr aufwendig, teuer, schlecht automatisierbar sind und somit nur geringen Probendurchsatz ermöglichen.

Wesentliche Fortschritte bei der Detektion kompetitiv amplifizierter DNA-Fragmente konnten mit einem immunologischen Meßverfahren unter Nutzung einer festen, mit einem Fangreagenz ausgestatteten Phase erreicht werden. Diese Technik wird in der Fachliteratur als PCR-ELISA (Enzyme-Linked Immunosorbent Assay, ALARD et al. BioTechniques; 15: 730—737 (1993), LEAR et al. BioTechniques; 18: 78—80, 82—83 (1995)) oder ELOSA (Enzyme-Linked Oligonucleotide Sorbent Assay, ADLER et al., DuPont Biotech Update; 7: 13—15 (1992), KÖHLER et al., Quantitation of mRNA by polymerase chain reaction — Nonradioactive PCR methods, Springer-Verlag, Heidelberg (1995)) bezeichnet und ist u. a. Gegenstand der Patente DE 41 29 653, DE 44 34 093, DE 42 34 086 und DE 42 12 555. Zunächst werden markierte Target- und Competitor PCR-Produkte hergestellt, die unter Einsatz eines am 5'-Ende entweder Biotin-markierten (JALAVA et al., BioTechniques; 15: 134—139 (1993), ALARD et al. BioTechniques; 15: 730—737 (1993), SANGIUTOLO et al., Int. J. Clin. Lab. Res.; 24: 223—226 (1994)) oder amidierten Primers (KOHSAKA et al., Nucl. Acids Res.; 21: 3469—3472 (1993)) sowie einem zugehörigen unmarkierten Primer synthetisiert werden. Die Produkte werden in einem nächsten Schritt mit hoher Affinität an eine feste Phase, z. B. mit Streptavidin-beschichteten bzw. carboxylierten Mikrotiterplatten, adsorbiert. Nachfolgend wird mittels alkalischer Denaturierung der jeweils komplementäre, nicht über das Hapten adsorbierte (d. h. der nichtmarkierte) DNA-Schwesterstrang entfernt. Zwischen Target-DNA und Competitor-Fragmenten wird nachfolgend in der Regel unterschieden, indem separat zwei für das jeweilige Fragment spezifische, nichtradioaktiv markierte DNA-Sonden eingesetzt werden, die an die entsprechend komplementären DNA-Zielstrangbereiche binden. Als Sondenmarkierung werden häufig die Haptene Digoxigenin (ALARD et al. BioTechniques; 15: 730—737 (1993), KOHSAKA et al., Nucl. Acids Res.; 21: 3469—3472 (1993)), Fluorescein (ADLER et al., DuPont Biotech Update; 7: 13—15 (1992)) oder eine Dinitrophenyl-Gruppe (LEHTOVAARA et al., J. Biol. Chem.; 269: 13337—13345 (1993)) eingesetzt. Alternativ kann auch die Sonde kovalent an die Mikrotiterplatte gekoppelt sein (SOLMET et al., BioTechniques; 19: 792—796 (1995)) so daß zuvor denaturierte, d. h. einzelsträngige PCR-Produkte aus dem Reaktionsansatz selektiv "herausgefischt" werden können. In diesem Fall wird nicht die Sonde, sondern das PCR-Produkt mit dem nachzuweisenden Hapten markiert. Die Detektion der DNA-Hybride erfolgt vorzugsweise über die Bindung von spezifischen, gegen das Hapten gerichteten Antikörpern, die mit einem Nachweiszym (z. B. Alkalische Phosphatase, Peroxidase) konjugiert sind und somit eine der adsorbierten DNA-Menge proportionale Farbreaktion katalysieren können (colorimetrische Detektion).

Alle oben beschriebenen Verfahren weisen aber einen gemeinsamen Nachteil auf: die vom Standard bzw. von der Ziel-DNA abstammenden PCR-Fragmente müssen sich mehr oder weniger deutlich in der Länge und/oder der Basensequenz unterscheiden, was im Widerspruch zum wünschenswerten Einsatz optimal homologer Standards in der kompetitiven PCR steht. Sind hingegen die zu unterscheidenden DNA-Moleküle in Länge und

Sequenz weitgehend identisch, ist die differentielle Detektion dann sehr problematisch. Auf differentieller Hybridisierung basierende Verfahren sind nur eingeschränkt möglich und zudem sehr aufwendig und störanfällig. Eine Lösung stellt das in DE 41 29 653 beschriebene Verfahren dar, das es gestattet, z. B. alle Nucleinsäuren, die sich lediglich in einer Punktmutation unterscheiden, nachzuweisen. Dies gelingt, indem zwei Fragment-spezifische komplementäre Oligonucleotidsonden eingesetzt werden, die nach Anlagerung an die Ziel-Sequenz eine Basenfehlpaarung (Mismatch) z. B. am 3'-Ende aufweisen. Die entstandenen Hybride müssen dann jedoch einer unvorteilhaften zweiten enzymatischen Verlängerungsreaktion unterworfen werden, wodurch nur im Falle korrekter Hybridisierung unterschiedlich lange Verlängerungsprodukte entstehen die beispielsweise unterschiedlich detektierbare Gruppen enthalten. Ein anderes Verfahren (HAHN et al, Anal. Biochem; 229: 236—248 (1995)) macht sich die hohe Spezifität von Restriktionsenzymen für Erkennung und zielgerichtetes Schneiden kurzer, beispielsweise durch gezielte Mutation entstandener Erkennungssequenzen für die Differenzierung zwischen weitgehend homologen DNA-Fragmenten zunutze. Hierbei werden in einem "single-tube nested PCR" Assay Target-DNA und ein nur um zwei Punktmutationen unterschiedlicher Competitor simultan amplifiziert. Das "nested" PCR Produkt wird durch Einsatz eines Biotin- sowie eines DIG-Primers doppelt markiert, über Streptavidin an Mikrotiterplatten-Kavitäten adsorbiert und dann vorteilhaft unter Einsparung der Denaturierungs- und Hybridisierungsschritte mittels anti-DIG-Antikörpern colorimetrisch detektiert. Mittels einer der eigentlichen Detektion vorgelagerten sog. "Selektive Restriction Enzyme Digestion (RED)" unter Einsatz zweier verschiedener, produktspezifisch eingesetzter Restriktionsenzyme wird eine Unterscheidung zwischen Competitor- und Target-Produkten ermöglicht. Nachteile dieses Verfahrens sind der bei einer "nested PCR" notwendige doppelte Pipettieraufwand, damit verbunden hohe Kosten für Verbrauchsmaterial sowie das Fehlen eines spezifischen Hybridisierungsschrittes zur zweifelsfreien Identifizierung spezifisch hergestellter Amplifikationsprodukte.

Aufgabe der vorliegenden Erfindung ist es, ein einfacheres Verfahren zur Bestimmung von Konzentrationsverhältnissen zweier ähnlicher Nucleinsäuren bereitzustellen, welches den Bedürfnissen von Routinediagnostiklabors besser gerecht wird.

Gegenstand der Erfindung ist daher ein Verfahren zum qualitativen und quantitativen Nachweis homologer Nucleinsäuren, welches mindestens folgende Teilschritte enthält.

- gleichzeitige Adsorption der nachzuweisenden ähnlichen Nucleinsäuren an eine feste Phase
- Ablösen der komplementären Schwesternstränge unter alkalischen Bedingungen mit dem Ziel, einzelsträngige Nucleinsäuren zu gewinnen
- Hybridisierung vorzugsweise einer selektiv bindenden, nichtradioaktiv markierten, einzelsträngigen DNA-Sonde, die an beide nachzuweisenden Einzelstrang-DNA-Fragmente spezifisch bindet, aber nur zu einem Fragment vollständig komplementär ist, in dessen Folge eine Fragment-spezifische Erkennungssequenz für ein bekanntes Restriktionsenzym entsteht
- Restriktionsverdau gekoppelt mit der selektiven Abspaltung der Sondenmarkierung
- Nachweis der an der Festphase adsorbierten Markierung entweder vor/nach Verdau vorzugsweise gekoppelt mit Fluoreszenzmessung bzw. ohne/nach Verdau vorzugsweise gekoppelt mit colorimetrischer Detektion

Ebenfalls Gegenstand der Erfindung sind ein Satz von Oligonucleotiden, ein Testkit und mehrere Verwendungsmöglichkeiten des Verfahrens.

Eine weitere Aufgabe der Erfindung besteht darin, eine Reihe von Störfaktoren bei der routinemäßigen Anwendung qualitativer und quantitativer DNA-Detektionstechniken auszuschalten. Diese bestehen vor allem im Auftreten von Amplifikationsartefakten, störender Heteroduplex-Bildung zwischen ähnlichen Nucleinsäuren sowie in unerwünschter Produktkontamination (sogenanntes "carry-over").

Ähnliche Nucleinsäuren im Sinne der Erfindung sind Nucleinsäuren, deren Nucleotidsequenzen im wesentlichen identisch sind, die jedoch an mindestens einer Position der Nucleotidsequenz einen Unterschied aufweisen. Vorzugsweise sind die Unterschiede auf maximal 100 Nucleotide begrenzt. Die Unterschiede können mit Ausnahme der terminalen Primerbindungsstellen und in Abhängigkeit von der Schaffung einer erfindungsgemäß erforderlichen Erkennungssequenz für ein bekanntes Restriktionsenzym jedes denkbare Nucleotid oder Gruppen benachbarter Nucleotide in der homologen Sequenz betreffen. Bevorzugt sind die zu unterscheidenden ähnlichen Nucleinsäuren Produkte einer vorgeschalteten spezifischen oder unspezifischen Nucleinsäurevermehrung (EP-A-0329822, EP-A-0237362, EP-A-0201 184, EP-A-0320308, WO-88/10315), wobei die Nucleinsäuren auch durch Klonierung oder in-vivo-Vermehrung entstanden sein können.

Die nachfolgend beschriebene Erfindung stellt ein molekularbiologisches Verfahren dar, das zur qualitativen und quantitativen Messung kleinster Mengen sequenzverschiedener Nucleinsäuren (z. B. kompetitiv amplifizierte Virus-Partikel bzw. zelluläre mRNA, mutierte Abschnitte genomischer DNA, allele Gene oder Genprodukte etc.) bevorzugt nach vorhergehender Amplifizierung geeignet ist. Bei dem erfindungsgemäßen Verfahren handelt es sich um eine spezielle Ausführungsform des sogenannten Hybridisierungstests, der in seinen Grundzügen dem Fachmann auf dem Gebiet der Nucleinsäurediagnostik bekannt ist. Das erfindungsgemäße Verfahren stellt eine weiterentwickelte Kombination von immunologischem Nachweis (PCR-ELISA) und selektivem Restriktionsenzym-Verdau dar. Mit Ausnahme der vorgeschalteten enzymatischen Amplifizierung können alle Schritte in einem Reaktionsraum (z. B. in den Kavitäten handelsüblicher, beschichteter Mikrotiter-Platten) durchgeführt werden.

Bevorzugt werden alle mittels spezifischer Nucleinsäurevermehrung (z. B. PCR) synthetisierten DNA-Fragmente (Competitoren und alle anfallenden PCR-Produkte) in ihrer Nucleotidsequenz abweichend von der nativen Sequenz derart verändert, daß alle physiologischen Desoxy-Thymidin (dT)-Nucleotide komplett durch

nicht-physiologisch vorkommende Desoxy-Uracil (dU)-Nucleotide ersetzt werden. Dieser Austausch gestattet es, mittels des Enzyms Uracil-DNA Glycosylase (UDG) in einem der Nucleinsäurevermehrung vorgelagerten Schritt Produktkontamination wirkungsvoll zu unterdrücken.

Die vorliegende Erfindung betrifft ein Verfahren, das unter Verwendung nur einer selektiven DNA-Sonde zur Bestimmung von Konzentrationsverhältnissen zweier ähnlicher, aber deutlich in der Länge differierender DNA-Fragmente (Analytnucleinsäuren) eingesetzt werden kann (Abb. 1). In einer bevorzugten Form der Ausführung kann mit dem erfindungsgemäßen Verfahren auch qualitativ und quantitativ zwischen ähnlichen Nucleinsäuren identischer Länge aber einer in mindestens einem Nucleotid unterschiedlichen Sequenz unterschieden werden (Abb. 2). Erfindungsgemäß sind alle durchzuführenden Verfahrensschritte in ihrem Grundablauf identisch. Unterschiede bestehen je nach Anwendungsproblem hinsichtlich der Struktur der eingesetzten Competitoren sowie der jeweils zugehörigen DNA-Sonden.

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Verfahrens werden die zu unterscheidenden Nucleinsäuren an einer aktiven, festen Phase adsorbiert. Hierzu wird bevorzugt das Bindepaar Biotin (Hapten)/Streptavidin (feste Phase) eingesetzt. Bevorzugt erfolgt die Adsorption Biotin-markierter Nucleinsäuren an Streptavidin-beschichtete Mikrotiterplatten (Abb. 1, 2; Schritt 1).

Die zu analysierenden Nucleinsäuren werden bereits während der Vermehrung in Abhängigkeit von der gewählten festen Phase mit einer zur Immobilisierung an die Phase befähigten Gruppe markiert und nachfolgend über diese Gruppe an der festen Matrix adsorbiert. Nach Entfernen des nicht direkt immobilisierten, komplementären DNA-Stranges mittels dem Fachmann bekannter, vorzugsweise alkalischer Denaturierung (Abb. 1, 2; Schritt 2) erfolgt die Anhybridisierung einer erfindungsgemäß speziell konstruierten, an beide Fragmente spezifisch bindenden, vorzugsweise am 5'-Ende markierten, einzelsträngigen DNA-Sonde (Abb. 1, 2; Schritt 3), welche ein synthetisches, der Zielsequenz komplementäres Oligonucleotid mit einer bevorzugten Länge von 20–50 Nucleotiden darstellt. Eine Markierung im Sinne der vorliegenden Erfindung besteht aus mindestens einer direkt oder indirekt nachweisbaren Gruppe. Direkt nachweisbare Gruppen sind beispielsweise fluoreszierende, farbige, Chemilumineszenz und Elektrochemilumineszenz vermittelnde Gruppen. Indirekt nachweisbare Gruppen sind immunologisch oder enzymatisch wirksame Verbindungen, wie z. B. Haptene, Antigene und Antikörper. Besonders bevorzugt sind nucleotid-gekoppelte, physiologisch nicht in der zu analysierenden Probe vorkommende Haptene, wie beispielsweise Digoxigenin oder Fluorescein. Die zur Unterscheidung ähnlicher Nucleinsäuren geeignete Sonde ist in ihrer Nucleotidsequenz speziell den jeweils nachzuweisenden und zu unterscheidenden Nucleinsäuren angepaßt, weist aber strukturell einige prinzipielle Eigenschaften auf: sie ist befähigt, spezifisch an beide zu unterscheidende DNA-Einzelstränge zu binden, jedoch zu 100% nur an eine von beiden Analytnucleinsäuren.

In der vorwiegend quantitativen Ausführungsvariante 1 bindet die Sonde am kürzeren der beiden zu unterscheidenden Stränge (Abb. 1: vom semi-homologen Competitor abgeleitetes Fragment, siehe auch Beispiel 1) zu mindestens 50% ihrer Sequenz (3B), während dieselbe Sonde am längeren Strang vollständig anhybridisiert und nur in diesem Fall eine verfahrensgemäß zur Unterscheidung notwendige Restriktionsschnittstelle entsteht (Abb. 1, 3A).

In der besonders bevorzugten qualitativ und quantitativ einsetzbaren Ausführungsvariante 2 (Abb. 2 und 3; Beispiel 2 und 3) bindet die erfindungsgemäße DNA-Sonde wiederum spezifisch an beide zu unterscheidenden, jedoch in diesem Fall gleich langen aber sich sequenziell um mindestens ein Nucleotid unterscheidenden Nucleinsäuren. Die Hybridisierung der Sonde an beide Fragmente erfolgt in diesem Fall jedoch über die gesamte Sondenlänge (Abb. 2, 3A + C). Vollständige Hybridisierung erfolgt aber wieder nur an einen der zu unterscheidenden DNA-Einzelstränge (Abb. 2, 3A). Der infolge Sondenhybridisierung hervorgegangene, durch vollständige Komplementarität gekennzeichnete, doppelsträngige DNA-Abschnitt weist nunmehr eine zur Unterscheidung genutzte Restriktionsschnittstelle auf. Diese Restriktionsschnittstelle enthält in der Erkennungssequenz vorzugsweise G- und C-Nucleotide.

Die Ausführungsvariante 3 (Abb. 3, Beispiel 3) dient vorzugsweise der qualitativen Unterscheidung von ähnlichen Nucleinsäuren, die in bevorzugter Weise Produkte spezifisch vervielfältigter genomischer DNA-Abschnitte sind und sich in ihrer Sequenz um mindestens ein Nucleotid unterscheiden. Hierbei sind beispielsweise Abschnitte von in der Sequenz variierenden Allelen eines Strukturgens gemeint, die sich um ein oder mehrere bekannte, örtlich abgegrenzte Mutationen unterscheiden. Erfordert die durchzuführende Analyse die Unterscheidung zwischen mehreren räumlich abgegrenzten Mutationen in der amplifizierten Analytnucleinsäure, ist die Anzahl der erforderlichen DNA-Sonden abhängig von der Entfernung der zu detektierenden Basenveränderungen sowie der Anzahl der zu unterscheidenden Mutationen (Abb. 3).

Die dem spezifischen Hybridisierungsschritt nachfolgenden Schritte sind wieder allen beschriebenen Ausführungsvarianten gemeinsam. Nur die im Falle vollständiger (100% iger) Sondenbindung erzeugten kurzen doppelsträngigen DNA-Abschnitte werden von einem erfindungsgemäß durch die generierte Restriktionsschnittstelle determiniertem Restriktionsenzym selektiv direkt an der festen Phase geschnitten (Abb. 1, 2; Schritt 4). Der markierte Teil der Sonde (Abb. 1–3, **) wird folglich abgespalten und durch einen nachfolgenden Waschschritt entfernt.

Im Gegensatz dazu bindet die DNA-Sonde an die vom jeweils anderen zu unterscheidenden Fragment stammenden DNA-Einzelstränge nur unvollständig. Das eingesetzte Restriktionsenzym kann in diesem Fall nicht schneiden, so daß die Sondenmarkierung weiterhin an der festen Matrix gebunden bleibt (Abb. 1; Schritt 3B, Abb. 2; Schritt 3C).

Nachfolgend wird die Matrix-immobilisierte, der adsorbierten Produktmenge proportionale Sonden-Markierung vor bzw. ohne und nach Restriktionsverdau gemessen. Die Messung erfolgt besonders bevorzugt direkt, indem die nachzuweisende Gruppe beispielsweise anhand ihrer Fluoreszenz nach entsprechender Anregung gemessen wird.

In einer weiteren bevorzugten Form der Ausgestaltung erfolgt die Messung indirekt nach Einsatz sekundärer, spezifischer, enzymkonjugierter Antikörper gegen die Sondenmarkierung (Abb. 1, 2; Schritt 5), gekoppelt mit einer nachfolgenden Farbreaktion und Messung der resultierenden Extinktion. Das Verhältnis zwischen quantitativ zu unterscheidenden Nucleinsäuren, beispielsweise Competitor- und Target-DNA abgeleiteten Produkten, wird dann einfach berechnet, indem die Differenz der Extinktionen ohne vorhergehenden Restriktionsenzym-Verdau (entspricht Gesamtmenge der Festphasen-adsorbierten DNA-Sonde) und nach selektivem Verdau (entspricht Menge des Fragments mit inkompletter Sondenhybridisierung) ermittelt und zur Ratio-Berechnung herangezogen wird.

Im Falle qualitativ zu unterscheidender, beispielsweise alleler, von beiden Eltern-Chromosomen stammender Analytnucleinsäuren (Ausführungsbeispiel 3, Tabelle 1) richtet sich die Höhe des meßbaren Signals nach der sogenannten Gendosis: bindet die zur Unterscheidung eingesetzte DNA-Sonde beispielsweise unvollständig an das Amplifikationsprodukt von Allel 1 und vollständig an Allel 2-Produkt wird ein maximales Signal im Assay dann gemessen, wenn das Allel 1 homozygot vorliegt. Ein halb-maximales Signal ist meßbar, wenn beide Allele heterozygot vorliegenden, während ein minimales Signal für das homozygote Vorliegen von Allel 2 spricht.

Die beschriebene Erfindung weist im Vergleich zu allen bekannten Techniken folgende Vorteile auf:

1. Verbesserte Automatisierbarkeit: Alle nach der einmaligen Amplifizierung folgenden Schritte einschließlich Restriktionsverdau werden nur noch in einem Reaktionskompartiment durchgeführt. Die Detektionsablauf wird vereinfacht, da nur noch ein Typ von DNA-Sonde benötigt wird.
2. Das Verfahren involviert einen zur zweifelsfreien Amplifikationsprodukt-Identifikation vom deutschen Gesetzgeber per DIN-Norm 58967-60 vorgeschriebenen spezifischen Hybridisierungsschritt. Es ist deshalb nach ausreichender Testung und Optimierung für klinisch-chemische Diagnostik einsetzbar.
3. Der durch die Sondenhybridisierung hervorgegangene kurze doppelsträngige DNA-Abschnitt weist erst infolge Sondenbindung eine Fragment-spezifische Restriktionsschnittstelle auf. Erfolgreicher Restriktionsverdau ist somit ein weiterer Nachweis für die Spezifität der zu unterscheidenden Nucleinsäuren.
4. Im Falle quantitativer Unterscheidung beispielsweise durch competitive PCR erzeugter DNA-Fragmente kann durch gezielte Mutation des jeweils eingesetzten Competitors und Design der entsprechend zugehörigen Sonde prinzipiell jedes Restriktionsenzym zur selektiven Differenzierung zwischen ähnlichen DNA-Fragmenten nutzbar gemacht werden, vorausgesetzt, das gewählte Enzym weist keine Fremdaktivität auf (unspezifisches Schneiden bei Enzymüberschuß) und schneidet keine DNA-Einzelstränge. Somit können von den geeigneten Enzymen immer die preisgünstigsten (z. B. Hha I, Hind III) gewählt werden. Im Falle direkter Messung der Fluoreszenz werden pro Doppelbestimmung im Idealfall nur 2 Kavitäten einer Mikrotiterplatte benötigt (im Vergleich hierzu benötigt der quantitative AmpliCor HCV- und HIV Monitor Test Kit, Fa. Roche Diagnostica, 8 Kavitäten pro Einfach-Bestimmung!).
5. Heteroduplex-Stränge stellen keine Fehlerquelle mehr dar, da diese genauso wie die korrekt gepaarten Stränge über ihre Biotin-Gruppe adsorbiert und als Einzelstränge detektiert werden.
6. Durch konsequenten Ersatz aller dT- durch dU-Nucleotide in allen Amplifikationsprodukten und wenn erforderlich auch Competitoren ist maximaler Kontaminationsschutz durch einen der Probenervielfältigung vorgeschalteten Uracil-DNA Glycosylase (UDG) Schritt möglich. Die Erkennungssequenz des gewählten Restriktionsenzym sollte dann bevorzugt aus G- und C-Nucleotiden bestehen.
7. Im Falle colorimetrischer Detektion ist eine einfache gerätetechnische Labor-Standardausrüstung (einfacher Mikrotiterplatten-Reader, Schüttel-Thermostat) ausreichend. Auf die teure Anschaffung von Spezialanalyse-Geräten (z. B. HPLC, Video-Densitometer) kann verzichtet werden.

Abb. 1 zeigt in theoretischer Form die vorwiegend quantitative Ausführungsvariante 1, wobei zwischen zwei semi-homologen, längenverschiedenen, competitiv amplifizierten Analytnucleinsäuren unterschieden wird.

Abb. 2 zeigt in theoretischer Form die besonders bevorzugte, qualitativ und quantitativ einsetzbare Ausführungsvariante 2, die eine Unterscheidung zwischen gleich langen, sich aber in der Sequenz um mindestens ein Nucleotid unterscheidenden Nucleinsäuren ermöglicht.

Abb. 3 zeigt den theoretischen Ansatz zur Isotypisierung der humanen ApoE-Allele 2, 3 und 4 mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens (qualitative Ausführungsvariante 2).

Abb. 4 zeigt am Beispiel der Quantifizierung von MRP-mRNA in der cytostatika-resistenten Zelllinie CCRF ADR 5000 (Ausführungsvariante 1, Beispiel 1) den Vergleich von Ergebnissen, die experimentell mit dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) erzielt wurden.

Abb. 5 zeigt am Beispiel Quantifizierung einer humanen single-copy Gen-Sequenz des Prothrombin-Gens zur molekularbiologischen Bestimmung kleiner Zellzahlen (Ausführungsvariante 2, Beispiel 2) eine experimentell durchgeführte competitive Titrationsanalyse.

Abb. 6 zeigt die Reproduzierbarkeit quantitativer Ergebnisse, die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren am Beispiel Analyse der in Abb. 5 dargestellten Titrationswerte erzielt wurden.

Die folgenden Beispiele dienen der Verdeutlichung der Erfindung.

Beispiel 1

Quantitatives PCR-ELISA zur Messung von "Multidrug resistance-associated protein (MRP)" mRNA

Probenvorbereitung

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens muß die nachzuweisende mRNA in für

in-vitro-Reaktionen geeigneter Form vorliegen. Dazu wird die zu untersuchende Probe auf bekannte Weise aufgeschlossen, die mRNA oder Total-RNA isoliert und mittels reverser Transcriptase in cDNA umgeschrieben.

Erfindungsgemäße Amplifikation mittels Competitiver PCR

5

Pro 50- μ l-Ansatz:

- 100 ng (+) Primer MRP3-Biotin
- 100 ng (–) Primer MRP4
- 10 – 2 μ l kalibriertes Competitor-Fragment ($1-1462 \times 10^{-21}$ mol)
- 8 μ l dNTP-Mix (Promega, Pharmacia): 125 μ l dATP, dCTP, dGTP, dUTP einer 100 mmol/l Stock-Lösung, verdünnt auf 1000 μ l mit H₂O
- 5 μ l PCR-Puffer, 10 \times conc. (Perkin-Elmer): 100 mmol/l Tris/HCl, 500 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl₂, 0.01% (w/v) Gelatine; autoklaviert; pH 8.3 (25°C)
- 15 – 0.2 U Uracil DNA-Glycosylase (Boehringer, Mannheim)
- 50 ng revers transkribierte RNA
- 1.5 U AmpliTaq Polymerase (Perkin-Elmer)
- Amplifikationsprogramm (GeneAmp 9600-Thermocycler (Perkin-Elmer)):
- Initiale Inkubation 15 min, 37°C
- 20 Denaturierung 10 min, 94°C; Halten bei 72°C (an dieser Stelle Zugabe von Competitor und Polymerase!)
- 35 Zyklen (30 sec 94°C, 30 sec 53°C, 1 min 72°C)
- Finale Elongation 10 min, 72°C.

- 25 – Länge des amplifizierten Target-Fragmentes: 344 Basenpaare, Länge des amplifizierten Competitor-Fragmentes: 256 Basenpaare.

Materialien

- 30 – Mikrotiterplatten, Streptavidin-beschichtet (z. B. Nunc Maxisorp)
- Sonde: MRPS5, 5' FITC-markiert 100% Hybridisierung am Target-Amplifikationsprodukt Hybridisierung über 19 bp am Competitor-Amplifikationsprodukt
- Schüttelinkubator für Mikrotiterplatten (37°C)
- 35 – Denley Well-Wash Mikrotiterplattenwascher
- Anthos 2001-Mikrotiterplattenreader.

Amplifikatvorbehandlung

- 40 Verdünnungspuffer: PBS/0.1% Tween 20 (1 mmol/l NaH₂PO₄, 14 mmol/l Na₂HPO₄, 140 mmol/l NaCl; pH 7.4, 0.1% (v/v) Tween 20)
- PCR-Ansätze 1 : 2000 mit PBS/0.1% Tween verdünnen.

Amplifikatimmobilisierung (Abb. 1 Schritt 1)

- Waschpuffer: PBS/1% Tween 20; pH 7.4
- 100 μ l verdünntes Amplifikat pro Kavität 1 Std. bei 37°C immobilisieren.
- 50 – 3 \times mit je 300 μ l Waschpuffer (PBS/1% Tween 20) waschen.

Blocken der Kavitäten

- Blocklösung: PBS/2% Tween 20
- 55 – Kavitäten 30 min mit jeweils 200 μ l PBS/2% Tween 20 bei Raumtemperatur blocken.
- 3 \times mit je 300 μ l Waschpuffer (PBS/1% Tween 20) waschen.

Alkalische Denaturierung (Abb. 1 Schritt 2)

- 60 Denaturierungslösung: 0.1 mol/l NaOH/ 0.3 mol/l NaCl
- mit jeweils 100 μ l Denaturierungslösung 10 min bei Raumtemperatur denaturieren.
- 3 \times mit je 300 μ l Waschpuffer (PBS/1% Tween 20) waschen.

65

Hybridisierung (Abb. 1 Schritt 3)

Hybridisierungslösung: 1 \times SSPE (150 mmol/l NaCl, 8.5 mmol/l Na₂HPO₄, 2 mmol/l EDTA; pH 7.4), 0.25%

(v/v) Dextransulfat Sonde: 0.15 pmol pro Kavität

- pro Kavität 100 µl Hybridisierungslösung (0.15 pmol Sonde enthaltend) pipettieren
- 1 Std. bei 37°C unter leichtem Schütteln (75 rpm) im Schüttelinkubator inkubieren.
- 3 x mit je 300 µl Waschpuffer (PBS/1% Tween 20) waschen

5

Restriktionsverdau mit Hha I selektives Schneiden der amplifizierten Target-DNA (Abb. 1 Schritt 4)

Restriktionspuffer (10 x conc.): 100 mmol/l Tris-acetat; pH 7.5, 100 mmol/l Mg-acetat, 500 mmol/l K-acetat

10

- 100 µl Restriktionspuffer, supplementiert mit 4 U Hha I (Pharmacia), in jede Kavität pipettieren
- Inkubation 1 – 3 Std. bei 37°C im Schüttelinkubator
- 3 x mit je 300 µl Waschpuffer (PBS/1% Tween 20) waschen

Detektion mit anti-FITC-POD Konjugaten Fab-Fragmente (Boehringer Mannheim) (Abb. 1 Schritt 5)

15

- Antikörper (150 U/ml) 1 : 4000 mit PBS/0.1% Tween 20 verdünnen
- Inkubation mit 100 µl verdünntem Antikörper pro well für 15 min bei 37°C
- 3 x mit je 300 µl Waschpuffer (PBS/1% Tween 20) waschen.

20

Kolorimetrische Detektion mit Tetramethylbenzidin (TMB)

– Lösung A: 15 mmol/l TMB in Dimethylformamid (DMFA)

- Lösung B: Citrat-Puffer: 8.4 g Zitronensäure (8.9 g Citrat x H₂O) ad 160 ml H₂O, mit 4N KOH auf pH 4.0 einstellen, auf 200 ml auffüllen, 200 µl H₂O₂ zugeben
- Stopplösung: 0.25 mol/l H₂SO₄, 8.5 mol/l Eisessig (4.86 ml Eisessig mit 1 N H₂SO₄ ad 10 ml auffüllen)
- kurz vor Färbeschritt 1 Teil Lösung A und 9 Teile Lösung B mischen (487.5 µl Lösung A und 4387.5 µl Lösung B ausreichend für 4 x 8er-Strips)
- 100 µl Färbelösung pro well, ca. 15 min Farbstoffbildung im Dunkeln abwarten
- mit 100 µl Stopplösung abbrechen und bei 450 (405) nm messen.

30

In Abb. 4 werden die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erzielten Ergebnisse mit den mittels Hochdruck-Flüssigchromatographie (HPLC) erhaltenen Werten verglichen.

100 ng Aliquote einer revers transkribierten Total-RNA wurden hierzu simultan mit (1) 1462, (2) 1462, (3) 73.1, (4) 29.3, (5) 14.6, (6) 9.7, (7) 5.8, (8) 2.9, (9) 1.5, (10) 1 zmol Competitor (1 zmol = 1 x 10⁻²¹ mol) pro Ansatz amplifiziert. Je 20 µl der PCR-Ansätze wurden über eine TSK DEAE-NPR Säule mit DEAE-NPR Vorsäule (TosoHaas GmbH, Stuttgart) unter Nutzung eines HPLC-Systems (Jasco Labor und Datentechnik GmbH, Gross-Umstadt) aufgetrennt, die Peaks wurden integriert und die Daten zur Berechnung der jeweiligen Produkt-Ratios eingesetzt. Zur Durchführung des erfindungsgemäßen PCR-ELISAs wurden die Ansätze in 1 : 2000 verdünnter Form eingesetzt. Insetierte Abbildung: konventionelle Agarosegel-Elektrophorese von je 10 µl kompetitiv amplifizierter MRP-cDNA (344 bp) und MRP-Competitor (256 bp), Banden Ethidiumbromid-gefärbt. M = Marker (100 bp-Leiter). Die hierbei erhaltenen und dargestellten PCR-ELISA Werte stellen Mittelwerte aus zwei unabhängigen Experimenten ± Standardabweichung (S.D.) dar. Wie aus der Abbildung weiterhin ersichtlich ist, können mit beiden Methoden prinzipiell gleiche Resultate (d. h. Schnittpunkt mit der y = 0 Geraden, der die initiale Konzentration des zu messenden Targets darstellt) erzielt werden.

50

55

60

65

Sequenzprotokolle

Primer MRP3

5

Sequenzlänge: 20 Basen
 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 10 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Position: 751-770 [Science 258, 1650-1654 (1992)]

15

5'-BIOTIN GCT.CGT.CTT.GTC.CTG.TTT.CT 3'

20

Primer MRP4

Sequenzlänge: 20 Basen
 25 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Position: 1071-1090 [Science 258, 1650-1654 (1992)]

30

5' CTC.CAC.CTC.CTC.ATT.CGC.AT 3'

35

Mutationsprimer MRP5 zur Herstellung des Competitor-DNA Fragments gemeinsam mit (+)-Primer MRP3

40

Sequenzlänge: 40 Basen
 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 45 Topologie: linear
 Position: 967-986/1071-1090 [Science 258, 1650-1654 (1992)]

50

5' CTC.CAC.CTC.CTC.ATT.CGC.ATC.CTT.CTT.CCA.GTT.CTT.TAC.C 3'

Sonde MRPS5

55

Sequenzlänge: 35 Basen
 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 60 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Position: 751-770 [Science 258, 1650-1654 (1992)]

65

5'-FITC CTA.GTC.TTG.GCG.CAT.TCC.TTC.TTC.CAG.TTC.TTT.AC 3'

Beispiel 2

Quantitatives PCR-ELISA zur Messung von humanen Prothrombin single-copy Gen-Sequenzen zur molekulargenetischen Bestimmung kleiner Zellzahlen

Probenvorbereitung

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens muß die nachzuweisende genomische DNA in für in-vitro-Reaktionen geeigneter Form vorliegen. Dazu wird die zu untersuchende Probe auf jeweils bekannte Weise aufgeschlossen sowie die DNA in möglichst intakter Form isoliert und in H₂O gelöst.

Erfindungsgemäße Amplifikation mittels Kompetitiver PCR

Pro 50-µl-Ansatz:

- 100 ng Primer HUMTHB1-Biotin
 - 100 ng Primer HUMTHB2
 - 5 µl Competitor-Fragment (10^{-18} — 10^{-24} mol)
 - 8 µl dNTP Mix (Promega, Pharmacia): 125 µl dATP, dCTP, dGTP, dUTP einer 100 mmol/l Stock-Lösung, verdünnt auf 1000 µl mit H₂O
 - 5 µl PCR-Puffer, 10 × conc. (Perkin-Elmer): 100 mmol/l Tris/HCl, 500 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl₂, 0.01% (w/v) Gelatine; autoklaviert; pH 8.3 (25°C)
 - 0.2 U Uracil DNA-Glycosylase
 - ca. 50 ng genomische DNA
 - 1.5 U AmpliTaq Polymerase (Perkin-Elmer)
 - Amplifikationsprogramm (GeneAmp 9600-Thermocycler (Perkin-Elmer)):
- Initiale Inkubation 15 min, 37°C

Denaturierung 10 min, 94°C; Halten bei 72°C (an dieser Stelle Zugabe von Competitor und Polymerase.)
40 Zyklen (45 sec 94°C, 30 sec 56°C, 1 min 72°C)
Finale Elongation 10 min, 72°C.

— Länge beider Amplifikationsprodukte: 460 Basenpaare.

Die PCR-Produkte werden 1 : 100—1 : 500 mit PBS/0.1% Tween verdünnt, pro Kavität werden 100 µl pipettiert. Die weiteren Schritte erfolgen analog Beispiel 1 mit Ausnahme Verwendung der Sonde THBSOND1 gleicher Konzentration. Mittels Hha I geschnitten werden in diesem Fall selektiv die Competitor-Sonde-Hybride.

Abb. 5 zeigt am Beispiel Quantifizierung einer humanen single-copy Gen-Sequenz des Prothrombin Gens zur molekulargenetischen Bestimmung kleiner Zellzahlen (Ausführungsvariante 2, Beispiel 2) eine experimentell durchgeführte kompetitive Titrationsanalyse.

ca. 40 ng gereinigte HeLa-DNA wurden simultan mit (1) 46032, (2) 23016, (3) 9206, (4) 4603, (5) 3069, (6) 1841, (7) 921, (8) 460 und (9) 184 Molekülen Competitor, der eine identische Länge im Vergleich zum Target-Produkt aufweist und sich in der Sequenz nur um einen G→C Austausch in Position 429 unterscheidet, amplifiziert. 15 µl eines jeden PCR-Ansatzes wurden nachfolgend 1 Std. bei 37°C mit 10 U Hha I verdaut, das Enzym wurde anschließend 10 min. bei 65°C inaktiviert. 1.5 µl-Aliquote der verdauten DNA wurden im 6%-Polyacrylamid-Gel aufgetrennt und mittels Silberfärbung sichtbar gemacht. Unverdautes Fragment (Target-DNA): 460 bp, verdautes Fragment (Competitor-DNA): 428 bp; T = separat amplifizierte Target-DNA, C = separat amplifizierte Competitor-DNA, M = Marker (100 bp-Leiter).

In Abb. 6 ist die Reproduzierbarkeit des Prothrombin PCR-ELISAs in Abhängigkeit von der PCR-Produkt Verdünnung vor Immobilisierung an der Mikrotiterplatte dargestellt. Die analysierten PCR-Produkte sind identisch mit den in Abb. 5 elektrophoretisch aufgetrennten Fragmenten.

Die Zellzahlberechnung erfolgte unter Verwendung folgender Formel:

Zellzahl pro Ansatz = Initiale Zahl Prothrombin-Gen Fragmente: 2 (Allele pro Zelle) Die Datenanalyse lieferte für die zwei durchgeführten Experimente folgende Werte:

Berechnung mittels linearer Regression: 371 Zellen (1 : 500 verd.), 331 Zellen (1 : 200 verd.) pro Ansatz Berechnung aus den Einzelwerten: 357 ± 156 Zellen/Ansatz (1 : 500), 351 ± 154 Zellen/Ansatz (1 : 200 verd.)

Sequenzprotokolle

5 Primer HUMTHB1 (entspricht Primer F ohne EcoRI-Klonierungsstelle, MAIN et al., In: Rolfs, Schumacher, Marx (Eds.), PCR Topics, Springer-Verlag Berlin, 1991, S.99-102)

Sequenzlänge: 20 Basen
 10 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 15 Position: 26278-26297 [Gene 95 (2), 253-260 (1990)]

5'-BIOTIN CTG.GGC.TAT.GAG.CTA.TGC.TC 3'

20 Primer HUMTHB2 (entspricht Primer G ohne PstI-Klonierungsstelle und A/E-C-Austausch in Position 26722, MAIN et al., In: Rolfs, Schumacher, Marx (Eds.), PCR Topics, Springer-Verlag Berlin, 1991, S.99-102)

25 Sequenzlänge: 20 Basen
 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 30 Topologie: linear
 Position: 26718-26737 [Gene 95 (2), 253-260 (1990)]

35 5' ATA.ATT.CTT.TCA.CGG.GAT.TG 3'

40 Mutationsprimer THB2HHA zur Herstellung des Competitor-DNA Fragments mit (+)-Primer HUMTHB1

Sequenzlänge: 35 Basen
 45 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Position: 26718-26737 [Gene 95 (2), 253-260 (1990)]

50 5' ATA.ATT.CTT.TCA.CGG.GAT.TGG.TTC.CAG.GAG.CGC.AG 3'

55 THBSONDI

Sequenzlänge: 24 Basen
 60 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Position: 26694-26717 [Gene 95 (2), 253-260 (1990)]

65 5'-FITC GTT.CCA.GGA.GCG.CAG.AAT.ATG.AGT 3'

Beispiel 3

Qualitatives PCR-ELISA zur Isotypisierung der humanen Apolipoprotein E-Allele E2, E3 und E4

Probenvorbereitung

5

Zur Durchführung des erfindungsgemäßen Nachweisverfahrens muß die nachzuweisende genomische DNA in für in-vitro-Reaktionen geeigneter Form vorliegen. Dazu wird die zu untersuchende Probe auf jeweils bekannte Weise aufgeschlossen sowie die DNA in möglichst intakter Form isoliert und in H₂O gelöst.

10

Erfindungsgemäße Amplifikation mittels PCR

Pro 50-µl-Ansatz:

- 100 ng Primer Primer F6-Biotin 15
- 100 ng Primer Primer F4
- 8 µl dNTP Mix (Promega, Pharmacia): 12.5 µl dATP, dCTP, dGTP, dUTP einer 100 mmol/l Stock-Lösung, verdünnt auf 1000 µl mit H₂O
- 5 µl PCR-Puffer, 10 × conc. (Perkin-Elmer): 100 mmol/l Tris/HCl, 500 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl₂, 0.01% (w/v) Gelatine; autoklaviert; pH 8.3 (25°C) 20
- 0.2 U Uracil DNA-Glycosylase
- 50–100 ng genomische DNA
- 1.5 U AmpliTaq Polymerase (Perkin-Elmer)
- Amplifikationsprogramm (GeneAmp 9600-Thermocycler (Perkin-Elmer)): 25
- Initiale Inkubation 15 min, 37°C

Denaturierung 10 min, 94°C; Halten bei 72°C (an dieser Stelle Zugabe der Polymerase!)

40 Zyklen (45 sec 94°C, 45 sec 60°C, 1 min 72°C)

Finale Elongation 10 min, 72°C.

30

- Länge der Amplifikationsprodukte: 245 Basenpaare.

Die zu analysierenden Amplifikationsprodukte werden auch in diesem Beispiel je nach erreichter Amplifikationseffizienz mit PBS/0.1% Tween verdünnt, pro Kavität werden wiederum 100 µl verdünntes Produkt eingesetzt. Die weiteren Detektionsschritte erfolgen analog Beispiel 1, mit Ausnahme Verwendung der beiden Sonden S112ARG und S158ARG. Aus Tabelle 1 ist ersichtlich, welche Sonden-Target-Hybride bei welcher Allel-Kombination mit dem auch bei diesem Beispiel eingesetzten Restriktionsenzym Hha I geschnitten werden.

40

45

50

55

60

65

Tabelle 1

Unterscheidung von ApoE-Allelen nach der Intensität der nach Hha I-Restriktionsverdau erhaltenen Signale

Allel-Kombination	Sonde	Restriktionsverdau mit HhaI/ CfoI möglich	adsorbiertes Signal nach Verdau [%]
2/2 (112CYS/158CYS)	S112ARG S158ARG	nein nein	100 100
3/3 (112CYS/158ARG)	S112ARG S158ARG	nein 100%	100 0
4/4 (112ARG/158ARG)	S112ARG S158ARG	100% 100%	0 0
4/2 (112CYS,ARG/ 158CYS,ARG)	S112ARG S158ARG	50% 50%	50 50
4/3 (112CYS,ARG/ 158ARG)	S112ARG S158ARG	50% 100%	50 0
3/2 (112CYS/ 158CYS,ARG)	S112ARG S158ARG	nein 50%	100 50

Sequenzprotokolle

Sequenzprotokolle

Primer F6 (EMI et al., Genomics 3, 373-379 (1988))

Sequenzlänge: 24 Basen
 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Position: 3868-3884 [Genomics 3, 373-379 (1988)]

5'-BIOTIN TAA.GCT.TGG.CAC.GGC.TGT.CCA.AGG 3'

Primer F4 (EMI et al., Genomics 3, 373-379 (1988))

Sequenzlänge: 20 Basen
 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Position: 4081-4095 [Genomics 3, 373-379 (1988)]

5' ACA.GAA.TTC.GCC.CCG.GCC.TGG.TAC.AC 3'

Sonde S112ARG

Sequenzlänge: 24 Basen
 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Position: 4081-4095 [Genomics 3, 373-379 (1988)]

5'-FITC CCA.GGC.GGC.CGC.GCA.CGT.CCT.CCA 3'

Sonde S158ARG

Sequenzlänge: 24 Basen
 Art der Sequenz: Desoxyribonucleotid
 Strangform: Einzelstrang
 Topologie: linear
 Position: 4081-4095 [Genomics 3, 373-379 (1988)]

5'-FITC ACA.CTG.CCA.GGC.GCT.TCT.GCA.GGT 3'

Patentansprüche

1. Verfahren zur Messung qualitativer und quantitativer Konzentrationsverhältnisse zweier sich in der Sequenz um mindestens ein Nucleotid unterscheidender Nucleinsäuren, welche durch PCR-Amplifizierung, Klonierung oder andere Vervielfältigungstechniken hergestellt werden, wobei je ein DNA-Strang eines jeden nachzuweisenden DNA-Fragmentes entweder während der Vervielfältigung oder nachträglich chemisch modifiziert oder mit einem Hapten markiert wird, über diese Modifizierung nachfolgend die Adsorption der Fragmente an eine geeignete aktive Festphase erfolgt und der nicht markierte Schwesternstrang mittels alkalischer Denaturierung entfernt wird, dadurch gekennzeichnet, daß die Anhybridisierung einer komplementären, bevorzugt 5'-markierten, einzelsträngigen DNA-Sonde erfolgt, deren Sequenz so gewählt wird, daß diese an beide zu unterscheidenden Nucleinsäurestränge spezifisch bindet, wobei nach erfolgter Hybridisierung ausschließlich bei vollständiger Komplementarität der Sonde ein partieller DNA-Doppelstrang entsteht, welcher nunmehr eine Fragment-spezifische Erkennungssequenz aufweist, die vorzugsweise unter Einsatz eines die Sequenz erkennenden Restriktionsenzym im Bereich der Doppelstrang-Region selektiv hydrolysiert wird, wobei gleichzeitig ein Teil der die Markierung tragenden Sonde abgespalten wird, während das unvollständig hybridisierte Fragment keinem solchem Restriktionsverdau unterliegt und die Sondenmarkierung weiterhin an der festen Phase immobilisiert verbleibt.

2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die erfindungsgemäße DNA-Sonde an der Festphase immobilisiert ist und keine Markierung trägt, während die zu unterscheidenden Nucleinsäuren bevorzugt am 5'-Ende nichtradioaktiv markiert sind und selektiver Restriktionsverdau nur bei vollständiger Sondenhybridisierung unter gleichzeitiger Abspaltung eines Teiles der die Markierung tragenden Analytnucleinsäure erfolgt.

3. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß zwei in einem Teil der Sequenz ähnliche, sich in der Länge aber wesentlich unterscheidende Fragmente so detektiert werden, daß eine Sonde konstruiert wird, welche zu mindestens 50% ihrer Länge in einem für beide Fragmente spezifischen, in der Nucleotidsequenz identischen Homologiebereich hybridisiert, wobei nur am längeren Fragment vollständige Sondenhybridisierung erzielt wird und nur dieses Fragment betreffend ein selektiver Restriktionsverdau mit resultierender Abspaltung der Sondenmarkierung erfolgt.

4. Verfahren gemäß Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß beide zu unterscheidenden Nucleinsäuren eine identische Zahl von Nucleotiden aufweisen, sich aber in der Sequenz um mindestens ein Nucleotid in beliebiger Position mit Ausnahme der Primerbindungsstellen unterscheiden und eine Sonde konstruiert wird, die nur einer entweder physiologisch oder gezielt mutierten Analytnucleinsäure vollständig komplementär ist und nach spezifischer Hybridisierung an die zu analysierenden Nucleinsäuren folglich nur das mutierte Fragment einem selektiven Restriktionsverdau unterliegt, wobei der die Markierung tragende Teil der Sonde oder gemäß Anspruch 2 der markierte Teil der mutierten Nucleinsäure abgespalten wird.

5. Verfahren gemäß Anspruch 4, dadurch gekennzeichnet, daß nach erfolgter Sondenhybridisierung nicht die mutierte sondern die Target-Nucleinsäure eine selektive Restriktionsschnittstelle aufweist.

6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—5, dadurch gekennzeichnet, daß die Unterscheidung von ähnlichen Nucleinsäuren durchgeführt wird, die in bevorzugter Weise Produkte spezifisch vervielfältigter genomischer DNA-Abschnitte — beispielsweise mutierter Abschnitte von in der Sequenz variierender Allele eines Strukturgens — sind und sich in ihrer Sequenz um mindestens ein Nucleotid unterscheiden, wobei sich die zu analysierenden Nucleinsäuren um ein oder mehrere Basenaustausche unterscheiden können sowie zur Analyse mehrerer räumlich abgegrenzter Mutationen in der amplifizierten Analytnucleinsäure die Anzahl der erforderlichen DNA-Sonden abhängig von der Entfernung der zu detektierenden Basenveränderungen sowie der Anzahl der zu unterscheidenden Mutationen ist.

7. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—6, dadurch gekennzeichnet, daß alle zugesetzten Competitoren sowie alle amplifizierten und zu analysierenden Nucleinsäuren in einem dem erfindungsgemäßen Verfahren vorhergehenden Schritt so in ihrer Basensequenz verändert werden, daß alle dT-Nucleotide durch dU-Nucleotide ersetzt werden.

8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1—7, dadurch gekennzeichnet, daß in einer bevorzugten Form der Ausgestaltung solche markierten Sonden und ggf. Competitoren eingesetzt werden, die eine Fragment-Unterscheidung mit Restriktionsendonucleasen erlauben, die keine Fremdaktivität aufweisen, keine DNA-Einzelstränge schneiden und vorzugsweise G- und C-Nucleotide in der Erkennungssequenz enthalten.

9. Testkit zur Bestimmung von Konzentrationsverhältnissen zweier sich um mindestens ein Nucleotid unterscheidender Nucleinsäuren, enthaltend einen Satz von Oligonucleotiden gemäß einem der Ansprüche 1—8, spezielle Mikrotiterplatten sowie ein zugehöriges Restriktionsenzym.

Hierzu 6 Seite(n) Zeichnungen

Abb.1: Competitive PCR-Amplifizierung von Ziel-DNA und semi-homologem Competitor

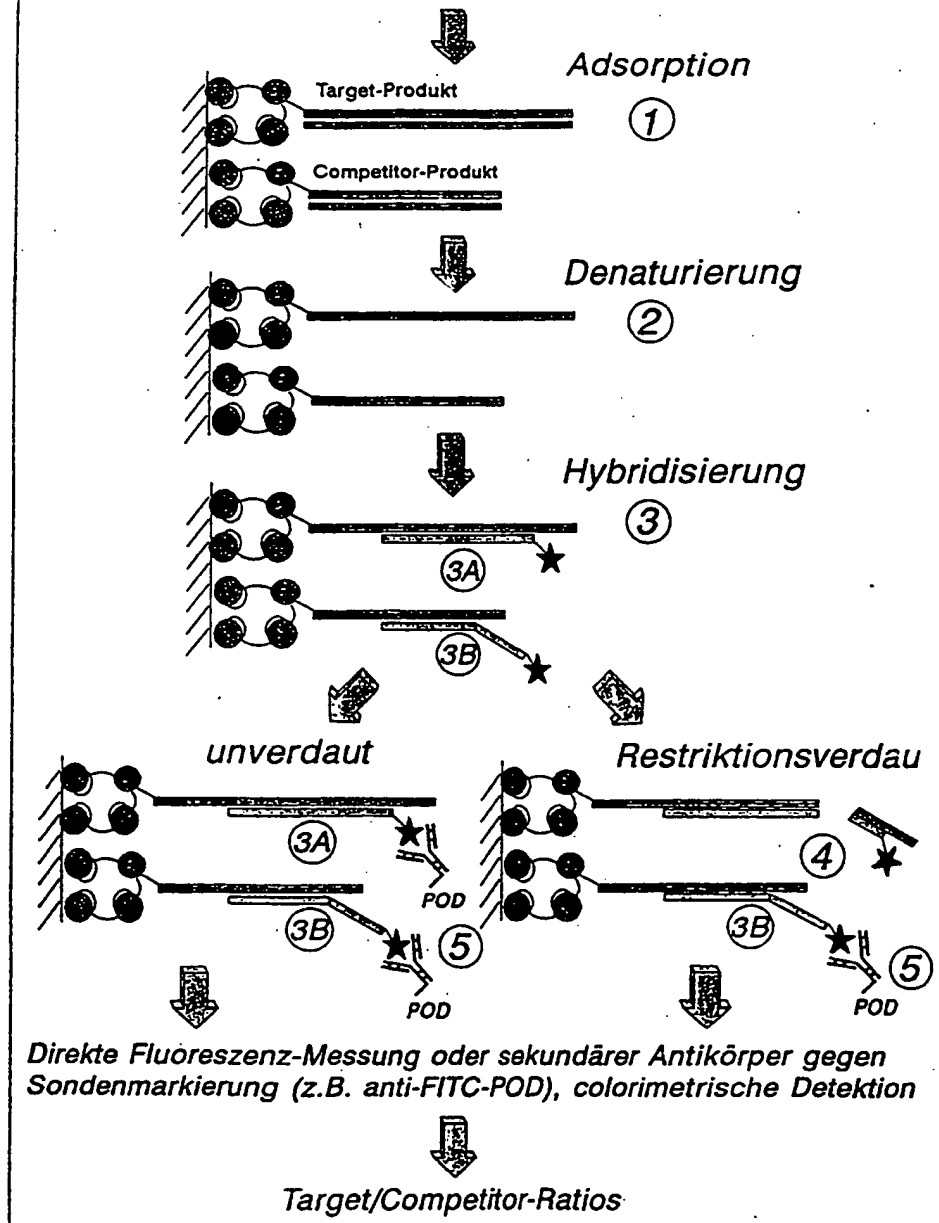


Abb.2:

Competitive PCR-Amplifizierung von Ziel-DNA und homologem Competitor

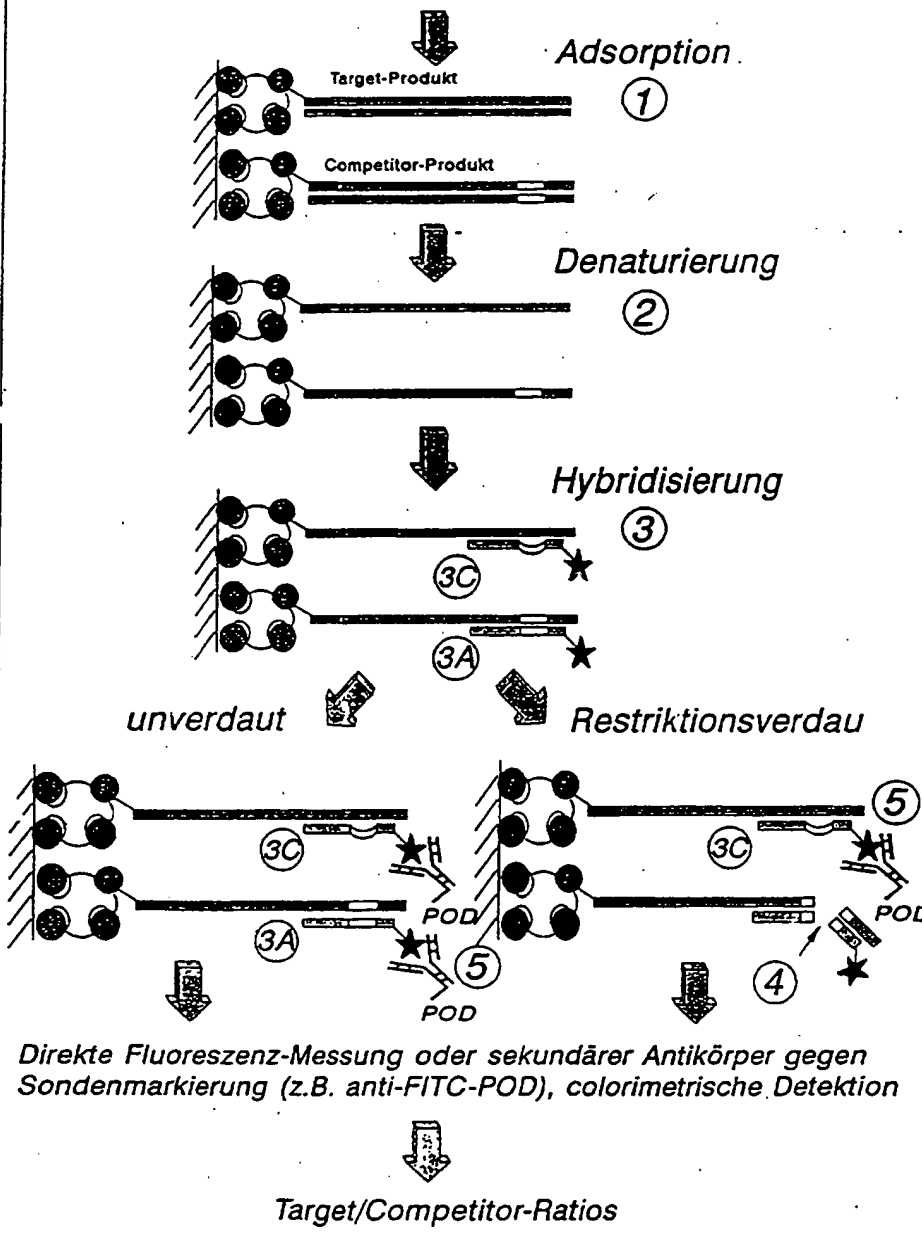
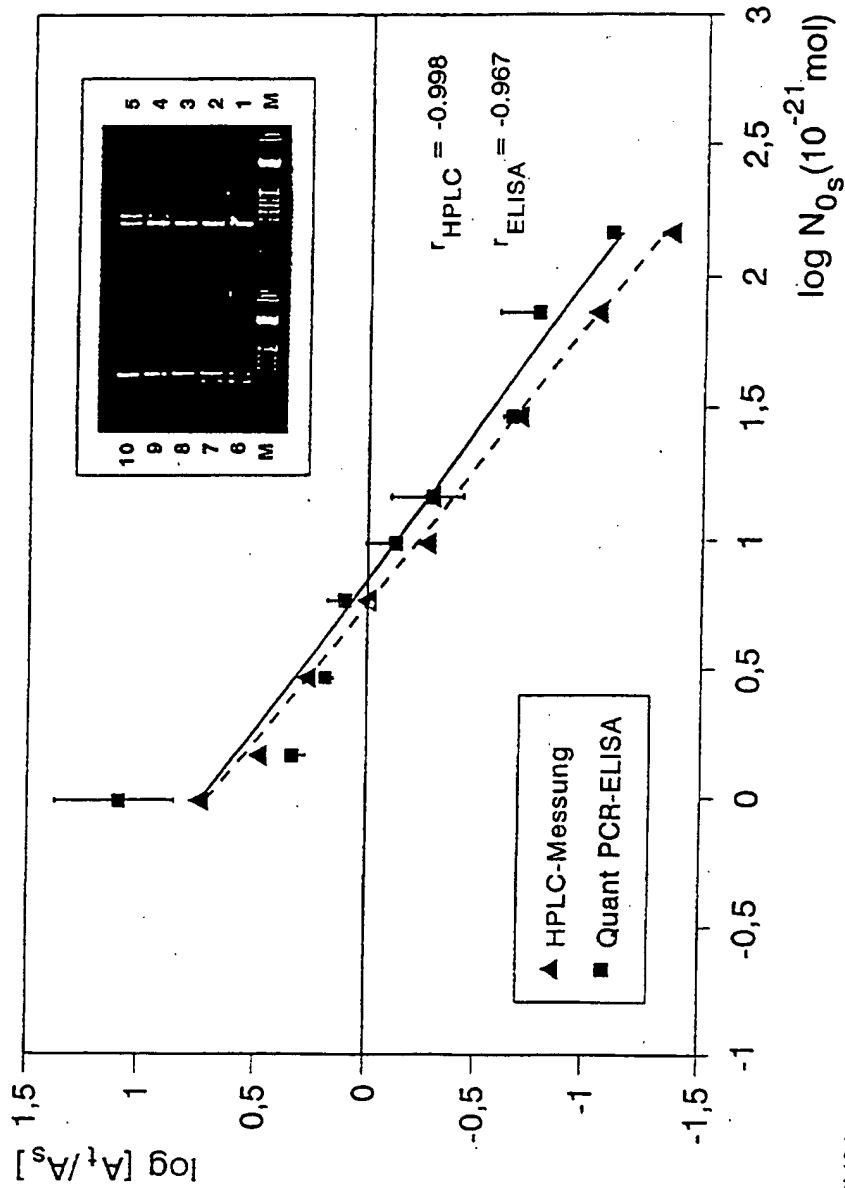


Abb.3: PCR-ELISA zur Isotypisierung von ApoE-Allelen

Sonde Allel	S112ARG	S158ARG
E 2 112 CYS/ 158 CYS	<p>112 158 5'-TGT GC-3' 3'-TGC-5' HhaI</p>	<p>112 158 5'-TGT GC-3' 3'-TGC-5' HhaI</p>
E 3 112 CYS/ 158 ARG	<p>112 158 5'-TGT GC-3' 3'-AGC-5' HhaI</p>	<p>112 158 5'-TGT GC-3' 3'-AGC-5' HhaI</p>
E 4 112 ARG/ 158 ARG	<p>112 158 5'-AGC GC-3' 3'-AGC-5' HhaI</p>	<p>112 158 5'-AGC GC-3' 3'-AGC-5' HhaI</p>

Abb.4: Quantitative Detektor: kompetitiv amplifizierter MRI mRNA mittels HPLC und PCR-ELISA



PCR-ELISA: 1:2000 verdünnte Amplifikate, gemittelte Werte \pm S.D. (n=2)

Abb.5:

Quantifizierung humaner Prothrombin-Gen Sequenzen mittels kompetitiver
Titrationsanalyse zur Zellzahlbestimmung (nach Restriktionsverdau mit Hha I)

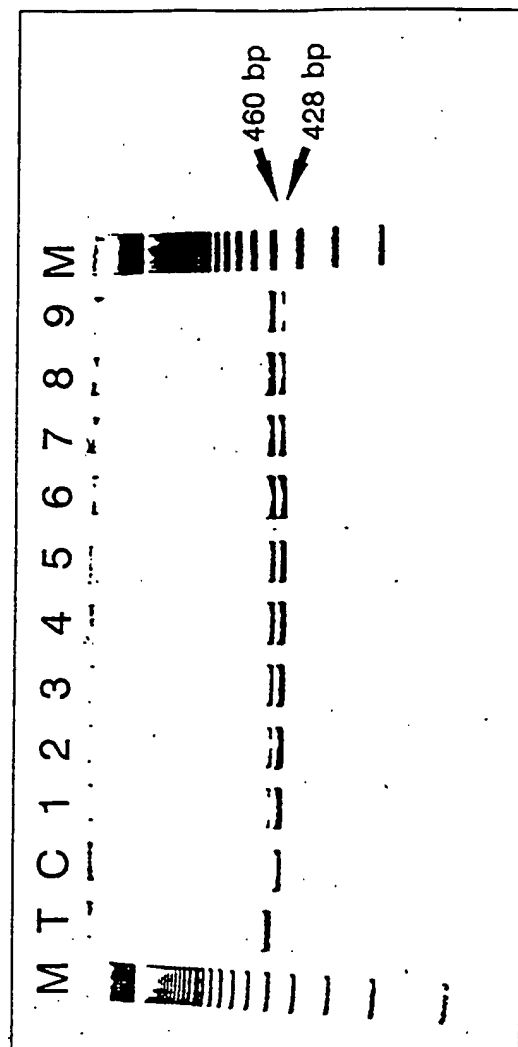
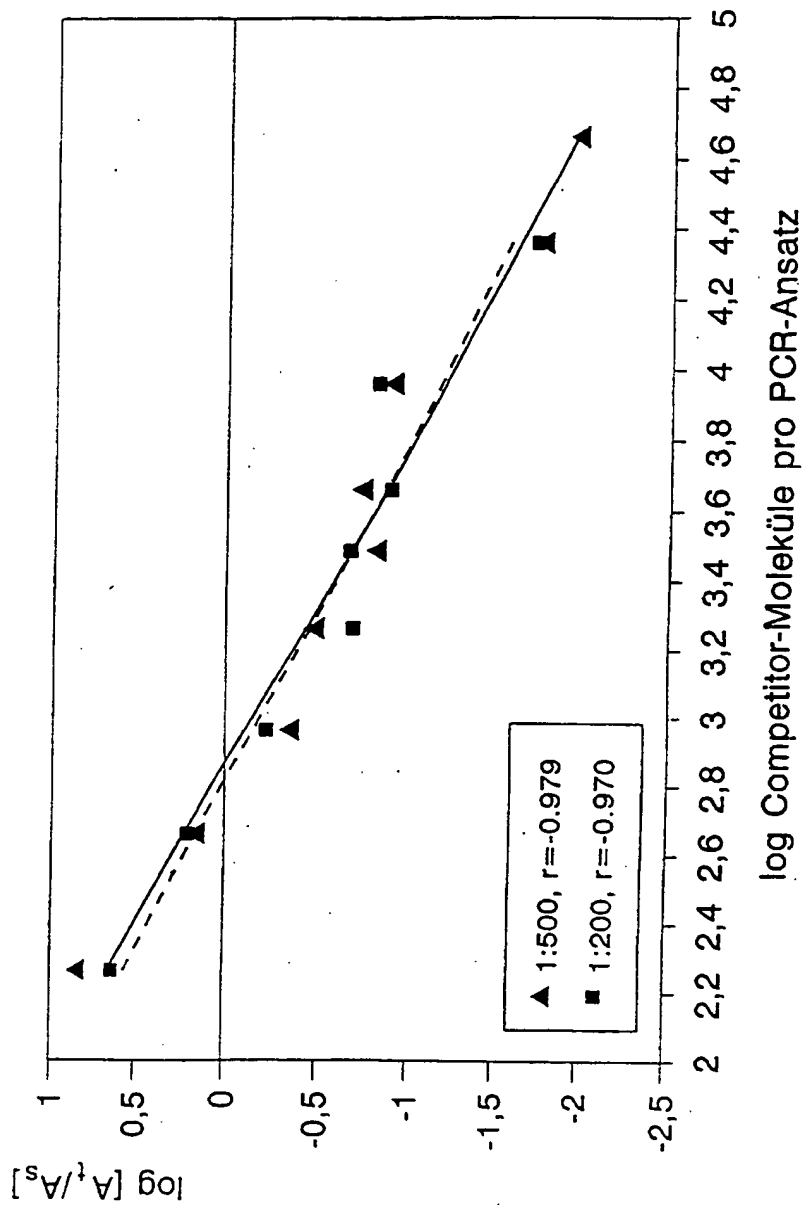


Abb. 6: Quantitative Detektion competitiv amplifizierter Prothrombin-DNA mittels PCR-ELISA
Reproduzierbarkeit in Abhängigkeit von der Amplifikatverdünnung



in-vitro-Reaktionen geeigneter Form vorliegen. Dazu wird die zu untersuchende Probe auf bekannte Weise aufgeschlossen, die mRNA oder Total-RNA isoliert und mittels reverser Transcriptase in cDNA umgeschrieben.

Erfindungsgemäße Amplifikation mittels Competitiver PCR

5

Pro 50- μ l-Ansatz:

- 100 ng (+) Primer MRP3-Biotin
- 100 ng (–) Primer MRP4
- 10 – 2 μ l kalibriertes Competitor-Fragment ($1-1462 \times 10^{-21}$ mol)
- 8 μ l dNTP-Mix (Promega, Pharmacia): 125 μ l dATP, dCTP, dGTP, dUTP einer 100 mmol/l Stock-Lösung, verdünnt auf 1000 μ l mit H₂O
- 5 μ l PCR-Puffer, 10 \times conc. (Perkin-Elmer): 100 mmol/l Tris/HCl, 500 mmol/l KCl, 15 mmol/l MgCl₂, 0.01% (w/v) Gelatine; autoklaviert; pH 8.3 (25°C)
- 15 – 0.2 U Uracil DNA-Glycosylase (Boehringer, Mannheim)
- 50 ng revers transkribierte RNA
- 1.5 U AmpliTaq Polymerase (Perkin-Elmer)
- Amplifikationsprogramm (GeneAmp 9600-Thermocycler (Perkin-Elmer)):
- Initiale Inkubation 15 min, 37°C
- 20 Denaturierung 10 min, 94°C; Halten bei 72°C (an dieser Stelle Zugabe von Competitor und Polymerase!)
- 35 Zyklen (30 sec 94°C, 30 sec 53°C, 1 min 72°C)
- Finale Elongation 10 min, 72°C.

- 25 – Länge des amplifizierten Target-Fragmentes: 344 Basenpaare, Länge des amplifizierten Competitor-Fragmentes: 256 Basenpaare.

Materialien

- 30 – Mikrotiterplatten, Streptavidin-beschichtet (z. B. Nunc Maxisorp)
- Sonde: MRPS5, 5' FITC-markiert 100% Hybridisierung am Target-Amplifikationsprodukt Hybridisierung über 19 bp am Competitor-Amplifikationsprodukt
- Schüttelinkubator für Mikrotiterplatten (37°C)
- 35 – Denley Well-Wash Mikrotiterplattenwascher
- Anthos 2001-Mikrotiterplattenreader.

Amplifikatvorbehandlung

- 40 Verdünnungspuffer: PBS/0.1% Tween 20 (1 mmol/l NaH₂PO₄, 14 mmol/l Na₂HPO₄, 140 mmol/l NaCl; pH 7.4, 0.1% (v/v) Tween 20)
- PCR-Ansätze 1 : 2000 mit PBS/0.1% Tween verdünnen.

- 45 Amplifikatimmobilisierung (Abb. 1 Schritt 1)

Waschpuffer: PBS/1% Tween 20; pH 7.4

- 100 μ l verdünntes Amplifikat pro Kavität 1 Std. bei 37°C immobilisieren.
- 50 – 3 \times mit je 300 μ l Waschpuffer (PBS/1% Tween 20) waschen.

Blocken der Kavitäten

Blocklösung: PBS/2% Tween 20

- 55 – Kavitäten 30 min mit jeweils 200 μ l PBS/2% Tween 20 bei Raumtemperatur blocken.
- 3 \times mit je 300 μ l Waschpuffer (PBS/1% Tween 20) waschen.

Alkalische Denaturierung (Abb. 1 Schritt 2)

- 60 Denaturierungslösung: 0.1 mol/l NaOH/ 0.3 mol/l NaCl

- mit jeweils 100 μ l Denaturierungslösung 10 min bei Raumtemperatur denaturieren.
- 3 \times mit je 300 μ l Waschpuffer (PBS/1% Tween 20) waschen.

65

Hybridisierung (Abb. 1 Schritt 3)

Hybridisierungslösung: 1 \times SSPE (150 mmol/l NaCl, 8.5 mmol/l Na₂HPO₄, 2 mmol/l EDTA; pH 7.4), 0.25%

DERWENT-ACC-NO: 1998-053314
DERWENT-WEEK: 199806
COPYRIGHT 1999 DERWENT INFORMATION LTD

TITLE: Determination of the concentration ratio of two
different nucleic acids
- using probe that forms cleavable duplex with one nucleic
acid

INVENTOR: KOEHLER, T; ROST, A

PATENT-ASSIGNEE: KOEHLER T[KOEHI], ROST A[ROSTI]

PRIORITY-DATA: 1996DE-1024562 (June 20, 1996)

PATENT-FAMILY:

PUB-NO	PUB-DATE	LANGUAGE
PAGES	MAIN-IPC	
DE 19624562 A1	January 2, 1998	N/A
020	C12Q 001/68	

APPLICATION-DATA:

PUB-NO	APPL-DESCRIPTOR	APPL-NO
APPL-DATE		
DE 19624562A1	N/A	1996DE-1024562
June 20, 1996		

INT-CL (IPC): C12Q001/68; G01N033/53

ABSTRACTED-PUB-NO: DE 19624562A

BASIC-ABSTRACT: Method for determining the concentration
ratio of two nucleic
acids [nucleic acids A and B] having sequences that differ
by at least one
nucleotide comprises: (a) amplifying the nucleic acids,
e.g. by PCR or cloning;
(b) immobilising the nucleic acids on a solid phase via a
chemical modification
or hapten label introduced into one strand during or after
amplification; (c)
removing the complementary strands by alkaline
denaturation; (d) hybridising
the immobilised strands [strands A and B] with a
single-stranded DNA probe
(preferably 5'-labelled) whose sequence is such that it

binds to both strand A
and strand B but is fully complementary only to strand A
and such that the
duplex formed with strand A has a recognition site for a
restriction enzyme
while the duplex formed with strand B does not; and (e)
selectively cleaving
the strand A duplex with the restriction enzyme so that the
probe label is
removed while the probe label of the strand B duplex
remains attached to the
solid phase. Also claimed is a method stated to be as
above where the probe is
unlabelled and is immobilised on the solid phase while the
analyte nucleic
acids are nonradioactively labelled, preferably at the 5'
end, and where the
restriction enzyme selectively cleaves the completely
hybridised analyte
nucleic acid to remove the label.

USE - The method is used to determine the ratios of
different alleles of a gene
or to determine mutation levels.

ADVANTAGE - The method is more suitable for routine use
using automated
equipment than prior art methods.

CHOSEN-DRAWING: Dwg.0/6

TITLE-TERMS:

DETERMINE CONCENTRATE RATIO TWO NUCLEIC ACID PROBE FORM
CLEAVE DUPLEX ONE
NUCLEIC ACID

DERWENT-CLASS: B04 D16 S03

CPI-CODES: B04-E03; B04-E05; B11-C07A; B12-K04A; D05-H09;
D05-H12D1; D05-H18;

EPI-CODES: S03-E14H4;

CHEMICAL-CODES:

Chemical Indexing M1 *01*

Fragmentation Code

M423 M750 M903 N102 Q233 V753

Chemical Indexing M1 *02*

Fragmentation Code

M423 M430 M782 M903 N102 P831 Q233 V753

Chemical Indexing M1 *03*

Fragmentation Code

M423 M430 M782 M903 N102 P831 Q233 V802 V812

Chemical Indexing M6 *04*

Fragmentation Code

M903 P831 Q233 R515 R521 R627 R639

SECONDARY-ACC-NO:

CPI Secondary Accession Numbers: C1998-018486

Non-CPI Secondary Accession Numbers: N1998-042118

50212405

L5 ANSWER 5 OF 13 CAPLUS COPYRIGHT 2003 ACS

ACCESSION NUMBER: 1993:642281 CAPLUS
DOCUMENT NUMBER: 119:242281
TITLE: Sequential deletions of single-stranded DNA. "Cyclone Sequencing"
AUTHOR(S): Murphy, George
CORPORATE SOURCE: JI Cent. Plant Sci. Res., Norwich, UK
SOURCE: Methods in Molecular Biology (Totowa, NJ, United States) (1993), 23(DNA Sequencing Protocols), 61-7
CODEN: MMBIED; ISSN: 1064-3745
DOCUMENT TYPE: Journal
LANGUAGE: English

AB Protocols are given for the cyclone sequencing procedure of R. M. K. Dale et al. (1985) which is totally independent of restriction sites in the insert. **Single-stranded** M13 DNA is hybridized to an oligomer that spans a **restriction site** of the polylinker, **generating** a region of double-stranded DNA. This region is digested with the appropriate enzyme, linearizing the phage, and then the 3'.fwdarw.5' exonuclease activity of T4 DNA polymerase is used to digest through the insert. The 3' end is then homopolymer tailed with terminal transferase, and the original oligomer, which has a 3' end complementary to the homopolymer tail, is reannealed across the restriction site and the homopolymer tail. After ligation the DNA is used to transform competent cells and the resulting plaques picked at random for screening.

50212405

L5 ANSWER 2 OF 13 CAPLUS COPYRIGHT 2003 ACS

ACCESSION NUMBER: 1998:21550 CAPLUS

DOCUMENT NUMBER: 128:111538

TITLE: Method and test kit for determining the concentration ratio of two nucleic acids distinguished by at least a nucleotide

INVENTOR(S): Koehler, Thomas; Rost, Anne-Katrin

PATENT ASSIGNEE(S): Koehler, Thomas, Germany; Rost, Anne-Katrin

SOURCE: Ger. Offen., 20 pp.

CODEN: GWXXBX

DOCUMENT TYPE: Patent

LANGUAGE: German

FAMILY ACC. NUM. COUNT: 1

PATENT INFORMATION:

PATENT NO.	KIND	DATE	APPLICATION NO.	DATE
DE 19624562	A1	19980102	DE 1996-19624562	19960620

PRIORITY APPLN. INFO.: DE 1996-19624562 19960620

AB A method for qual. or quant. detn. of concn. ratios of two similar nucleic acids is described. The method comprises (1) immobilization of both target nucleic acids; (2) alk. denaturation of the target nucleic acids; (3) hybridization of the resulting **single-stranded** nucleic acids with nonradioactive but labeled probes, which bind specifically to both targets but are only completely complementary to one, in which case a **restriction site is created**; (4) digestion with a restriction enzyme; and (5) fluorometric or colorimetric detn. of marker retained on the solid phase. Quant. PCR-ELISA detn. of multidrug resistance protein mRNA or human prothrombin gene sequences and qual. PCR-ELISA isotyping of human apolipoprotein E alleles was demonstrated.